



# 热激蛋白 70 对黄瓜花叶病毒侵染的影响及其调控机制

林梦君<sup>1</sup>, 郭歌<sup>2</sup>, 卢冉<sup>1</sup>, 杜志游<sup>1</sup>

(1. 浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018; 2. 皖北卫生职业学院医学技术系, 宿州 234099)

**摘要:** 真核生物中高度保守的热激蛋白 70 (Heat shock protein, HSP70) 参与众多细胞活动。为明确 HSP70 在黄瓜花叶病毒 (Cucumber mosaic virus, CMV) 侵染过程中的作用, 在 CMV 侵染的不同时期, 通过定量 RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) 检测本氏烟中细胞质定位 HSP70 的 mRNA 含量, 分析本氏烟中 HSP70 的表达量降低和在本氏烟 HSP70 瞬时表达对 CMV 症状反应和基因组 RNA 积累量的影响, 并评估 CMV 微型复制子 1a2aR3-gfp 在 HSP70 瞬时表达本氏烟中绿色荧光表型和基因组 RNA 的含量。结果表明: 在 CMV 侵染 3、5 d 和 7 d 的本氏烟中, 与对照相比, HSP70 的 mRNA 含量至少增加了 1 倍, 在 HSP70 瞬时表达本氏烟中 CMV 症状反应加重、病毒含量增加; CMV 在 HSP70 下调表达本氏烟中症状反应减轻、病毒基因组含量降低; 在 HSP70 瞬时表达的浸润叶中, 1a2aR3-gfp 的绿色荧光表型、RNA3/RNA4 的积累量和绿色荧光蛋白 (Green fluorescence protein, GFP) 表达水平均明显增加。该文初步证明了 HSP70 通过参与病毒基因组 RNA 复制来影响 CMV 症状反应和基因组含量, 正调控 CMV 侵染过程, 这为进一步解析 CMV 与植物互作的分子调控机制提供了理论依据。

**关键词:** 黄瓜花叶病毒; 本氏烟; 热激蛋白 70; 下调表达; 瞬时表达; 基因组积累量

**中图分类号:** S432.41

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-3851 (2026) 03-0182-08

**引文格式:** 林梦君, 郭歌, 卢冉, 等. 热激蛋白 70 对黄瓜花叶病毒侵染的影响及其调控机制[J]. 浙江理工大学学报 (自然科学), 2026, 55(2): 182-189.

**Reference Format:** LIN Mengjun, GUO Ge, LU Ran, et al. The effect of heat shock protein 70 on cucumber mosaic virus and its regulatory mechanism[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2026, 55(2): 182-189.

## The effect of heat shock protein 70 on cucumber mosaic virus and its regulatory mechanism

LIN Mengjun<sup>1</sup>, GUO Ge<sup>2</sup>, LU Ran<sup>1</sup>, DU Zhiyou<sup>1</sup>

(1. College of Life Science and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;  
2. Department of Medical Technology, North Anhui Health Vocational College, Suzhou 234099, China)

**Abstract:** Heat shock protein 70 (HSP70), which is highly conserved in eukaryotes, is involved in a variety of cellular activities. To clarify the role of HSP70 in the infection process of cucumber mosaic virus (CMV), the mRNA content of cytoplasm-localized HSP70 in *Nicotiana benthamiana* was detected by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) at different stages of CMV infection. The effects of decreased HSP70 expression and transient HSP70 expression in *Nicotiana benthamiana* on CMV symptom development expression and genomic RNA accumulation were analyzed. Additionally, the green fluorescent phenotype and genomic RNA content of the CMV mini-replicon 1a2aR3-gfp in *N. benthamiana* with transient HSP70 expression were evaluated. The results showed that

收稿日期: 2025-01-22 网络出版日期: 2025-09-17

基金项目: 浙江省“领雁”科技攻关计划项目(2023C02018); 国家自然科学基金项目(32070154)

作者简介: 林梦君(2000—), 女, 浙江温州人, 硕士研究生, 主要从事植物-病毒互作方面的研究。

通信作者: 杜志游, E-mail: Duzy@zstu.edu.cn

compared with the control group, the mRNA content of *HSP70* in plants infected with CMV for 3, 5, and 7 days increased by at least 100 fold. In *N. benthamiana* with transient *HSP70* expression, CMV symptoms were aggravated and viral content increased; in contrast, when *HSP70* expression was down-regulated in host plants, CMV symptoms were alleviated and the content of viral genome decreased. Furthermore, in the infiltrated leaves with transient *HSP70* expression, the green fluorescent phenotype of 1a2aR3-*gfp*, the accumulation of RNA3/RNA4, and the expression level of green fluorescent protein (GFP) all increased significantly. This study preliminarily demonstrated that *HSP70* affects CMV symptom development and genomic content by participating in viral genomic RNA replication, thereby positively regulating the CMV infection process. This provides a theoretical basis for further analyzing the molecular regulatory mechanism of the interaction between CMV and plants.

**Key words:** cucumber mosaic virus; *Nicotiana benthamiana*; heat shock protein 70; down-regulated-expression; transient expression; accumulation of genomic RNAs

## 0 引言

在病毒侵染的过程中,如何利用寄主细胞蛋白因子进行基因组复制并产生足够的子代以保证其存活是病毒要面对的最核心的问题之一<sup>[1]</sup>。大多数病毒侵染均需寄主中分子伴侣类蛋白的参与,才能正确折叠新合成的病毒蛋白质,并通过其干扰信号转导、周期调控和凋亡诱导等细胞途径,减轻寄主的应激反应和促进病毒的增殖<sup>[2-4]</sup>。真核生物中高度保守的分子伴侣——热激蛋白 70(Heat shock protein 70, HSP70),是被病毒利用最为广泛的蛋白因子之一,它通过调控蛋白质构象折叠、错误折叠/聚集的蛋白质重新折叠、受体转运、蛋白质复合物的组装或拆卸以及蛋白质的降解等方式调控病毒的侵染,在基因组复制、病毒粒子组装和系统性扩展等过程中发挥关键作用<sup>[5-9]</sup>。

HSP70 在病毒侵染寄主过程中的作用已有大量的报道,番茄丛矮病毒(Tomato bushy virus, TBSV)复制酶 p33 和 p92<sup>pol</sup> 在寄主细胞的过氧化物酶体膜周边集聚需要 HSP70 的参与,影响病毒复制蛋白的亚细胞定位、膜插入和病毒复制复合体(Viral replication complex, VRC)的形成<sup>[10]</sup>;本氏烟中 *HSP70* 的转录水平由烟草脆裂病毒(Tobacco rattle virus, TRV)介导基因沉默降低后,TBSV 引起的症状反应明显减轻<sup>[11]</sup>。DOF 类转录因子通过结合在基因启动子区域来调控 *HSP70* mRNA 的转录,大麦黄矮病毒(Barley yellow dwarf virus, BYDV)编码的 p3a 能抑制植物的免疫反应,促进病毒侵染,p3a 与 DOF 类转录因子的锌指功能域直接结合,竞争性地抑制该转录因子与 *HSP70* 启动子区域相互作用,促进 *HSP70* 转录 mRNA 过程<sup>[12]</sup>。麻花叶病毒(Abutilon mosaic virus, AbMV)侵染寄

主期间,叶绿体 HSP70 与 AbMV 编码的移动蛋白(Movement protein, MP)形成的复合物在细胞外围与叶绿体中集聚,植物中 *HSP70* 下调表达抑制了病毒的运动,但对病毒的复制没有明显影响<sup>[13]</sup>。上述研究表明:植物中 *HSP70* 是病毒侵染必不可少的蛋白因子,它通过与病毒编码的功能蛋白发生相互作用,在病毒的复制、移动和植物抗病反应的过程中发挥作用。

黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)是全球危害最为严重的病毒之一,侵染的植物超过 1200 多种,包括拟南芥、本氏烟等模式植物以及番茄、大豆、玉米等重要的农作物<sup>[14]</sup>。CMV 基因组由 3 条正义 RNA 分子(RNA1、RNA2 和 RNA3)组成,在植物中病毒产生 5 条 RNA 分子,编码 5 个蛋白,其中:RNA1 编码复制酶 1a, RNA2 通过亚基因组策略编码复制酶 2a 和 2b 蛋白, RNA3 的 5' 端编码移动蛋白 3a、3' 端编码外壳蛋白(Coat protein, CP)<sup>[15]</sup>。复制酶 1a 和 2a 与植物中的蛋白因子结合形成的 VRC, 2b 蛋白是病毒诱导基因沉默抗性的抑制子, 3a 和 CP 参与病毒的胞间移动和长距离扩展<sup>[16]</sup>。CMV 基因组 RNA 复制在植物的液泡膜周边进行,复制酶 1a 将 2a 和植物蛋白因子招募到液泡膜以形成复制复合体,驱动病毒的复制过程<sup>[17]</sup>。锌指蛋白 Tsip1 被复制酶 1a 招募到液泡膜周边集聚,与复制酶 2a 形成复合物来调控 CMV 的增殖;在 *Tsip1* 转基因过表达植物中,CMV 症状反应推迟<sup>[18]</sup>。病毒侵染能诱导植物中 *HSP70* 表达量增加,与健康植物相比, *HSP70* 表达量增加了 2~5 倍<sup>[11, 13, 19]</sup>,表明病毒侵染过程中有可能需要利用植物的 HSP70。42 °C 处理 2 h 的本氏烟中 *HSP70* mRNA 含量与 CMV 侵染本氏烟中 *HSP70* mRNA 含量相当;CMV、烟草花叶病毒(Tobacco mosaic

virus, TMV) 和马铃薯 X 病毒 (Potato virus X, PVX) 在经高温处理本氏烟中引起的症状反应更为严重、病毒的基因组 RNA 含量均明显增加, 在异源瞬时表达拟南芥 *HSP70* 的本氏烟中, 病毒侵染速度明显高于对照<sup>[20]</sup>, 这说明了 *HSP70* 参与了 CMV 等病毒侵染植物的过程, *HSP70* 参与 CMV 的基因组复制、胞间移动及长距离扩展与植物的抗病反应的哪一个环节, 有待于进一步的研究。

本文在 CMV 侵染不同时期对本氏烟中细胞质定位 *HSP70* 的 mRNA 含量进行定量反转录 PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 分析, 评估该病毒在 *HSP70* 表达量降低植株中引起的症状反应和基因组 RNA 积累量, 测定经特异性抑制 *HSP70* 合成的化学试剂处理的本氏烟中 CMV 基因组含量; 并分析在瞬时表达 *HSP70* 的接种叶中 CMV 基因组含量, 确定 *HSP70* 在 CMV 侵染过程中的作用, 以期为进一步解析 *HSP70* 调控病毒侵染的分子机制奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒、植物与试剂

#### 1.1.1 植物

CMV 基因组 RNA1、RNA2 和 R3 农杆菌侵染性克隆 pCMV-R1、pCMV-R2 和 pCMV-R3, CMV 复制酶 1a/2a 瞬时表达 pCB301-1a/pCB301-2a、pCB301-R3-*gfp* 载体和 T-DNA 瞬时表达载体 pCambia1300<sup>[21]</sup>, 以上载体均保存于本实验室, pTRV1 农杆菌和 pTRV2 质粒由清华大学生命科学院刘玉乐教授提供。寄主植物为本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*), 本氏烟幼苗移栽后, 在 25 °C、16 h 光照/8 h 黑暗周期的温室中培育至 5~7 叶期, 用于 CMV 的农杆菌浸润接种。

#### 1.1.2 试剂

高保真 DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶 (NEW ENGLAND Biolabs), 限制性内切酶 *Xba* I、*Mul* I、*Bam*H I 和 *Sma* I (北京宝生物科技有限公司), FastPure Plant Total RNA Isolation Kit, 2× Rapid Taq Master Mix、HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 和 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (南京诺唯赞生物技术有限公司), Myc-tag 单克隆抗体、GFP 单克隆抗体和羊抗鼠二抗 (杭州华安生物技术有限公司) 和 DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (瑞士 Roche 公司), 其他常规生化试剂均购自上海

生物工程有限公司。

### 1.2 *HSP70* 下调和过表达载体的构建

本文分析本氏烟中细胞质定位的 *HSP70*<sup>[11]</sup> 在 CMV 侵染过程中的作用, 细胞质定位的 *HSP70* 基因序列登录号为 KX912913.1, 根据参考文献[11], RT-PCR 扩增 *HSP70* 基因沉默插入片段 (370 bp) 和 *HSP70* 全长序列 (1950 bp); 通过病毒介导的基因沉默方法降低本氏烟中该基因的 mRNA 含量, 并通过 T-DNA 载体在本氏烟的浸润接种叶中瞬时表达 *HSP70*。采用 FastPure Plant Total RNA Isolation Kit 提取本氏烟的总 RNA, 具体方法参考试剂盒说明书。以本氏烟总 RNA 为模板, 利用 HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 进行 cDNA 合成, 具体方法参考试剂盒说明书; 以 cDNA 为模板, 通过引物对 5' CGtctaga GGATGCTGGT GTTATTGCTGG3'/5' CGacgcgtGGTCTGAGCG GTGGATGAAA 3' 进行 PCR 扩增, 获得长度为 370 bp 产物, 通过 *Xba* I /*Mlu* I 双酶切克隆到病毒诱导的基因沉默载体 pTRV2 中, 获得重组克隆 pTRV2-*HSP70*。以 cDNA 为模板, 通过引物对 5' CGggtaccGTCCCAAGATCGAGGAGGTCGAC 3'/5' TCCcccgggTCAttcattcaagtcctcttcagaatgagcttttgc ccatGTCCTTCACCTTTTCTCGCCAT 3', 采用高保真聚合酶进行 PCR 扩增, 获得约 2000 bp 大小 DNA 片段, 目的片段经 *Bam*H I 和 *Sma* I 双酶切克隆至载体 pCambia1300 中, 获得瞬时表达 *HSP70* 载体 pCambia1300-*HSP70*。上述 2 个载体均通过 Sanger 测序验证其正确性。

### 1.3 载体的农杆菌转化与病毒菌浸润接种

质粒 pTRV2-*HSP70* 和 pCambia1300-*HSP70* 转化至农杆菌 GV3101, 农杆菌 TRV1、pCMV-R1、pCMV-R2 和 pCMV-R3 的活化, 农杆菌扩大培养与菌体收集、农杆菌浸润接种等参考文献[21]。由农杆菌 pCMV-R1、pCMV-R2 和 pCMV-R3 组成的混合物为病毒 R1R2R3; 由农杆菌 pCB301-1a、pCB301-2a 和 pCB301-R3-*gfp* 组成的混合物为 CMV 微型复制子 1a2aR3-*gfp*, 该病毒 CP 被绿色荧光蛋白 (Green fluorescence protein, GFP) 代替, 复制酶 1a 和 2a 由 T-DNA 载体瞬时表达, 侵染植物后表达绿色荧光蛋白, 不能够在植物细胞之间移动; TRV 基因组 RNA1 的农杆菌分别与 pTRV2 农杆菌和 pTRV2-*HSP70* 农杆菌混合, 组成病毒 TRV-Control 和 TRV-*HSP70*; 在 *HSP70* 过表达对 CMV 侵染的影响的测试中, 农杆菌 pCambia1300

和 pCambia1300-HSP70 分别与农杆菌 pCMV-R1、pCMV-R2 和 pCMV-R3 农杆菌混合。各个处理的农杆菌混合物用 1 mL 去针头注射浸润接种本氏烟第 4~5 真叶,接种植物于黑暗处理 24 h 再置于温室培养。TRV-HSP70/Control 农杆菌浸润接种于 6~8 叶期本氏烟第 5 片真叶,10 d 分别采集各个处理植株系统叶用于 *HSP70* 的 mRNA 的荧光定量 PCR 分析;在 *HSP70* 下调表达的植株第 4 叶再农杆菌浸润接种 CMV。

#### 1.4 定量 RT-PCR 检测 *HSP70* 表达量

分别采集 CMV 和 Mock 接种本氏烟 0、3、5 d 和 7 d 的系统叶,并提取各个样品的总 RNA。以反转录试剂盒 HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 的 oligo(dt) 为引物合成 cDNA,各个样品的 cDNA 合成的反应体系、反应参数均按照试剂盒说明书进行。采用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒检测本氏烟中 *HSP70* 的相对表达量,方法按照试剂盒使用说明书进行,*HSP70* 定量 RT-PCR 引物对为 5' GGACCCTTTCATCCACCGCTC 3'/5' AGCTTCGTCGGGGTTGATGC 3',以 *Actin* 内参基因,检测引物对为 5' GATGAAGATACTCACAGAAAGA 3'/5' GTGGTTTCATGAATGCCAGCA 3',每个样品 3 个重复。病毒接种 10 d,采集浸润接种叶往上数第 4 片叶子,提取其总 RNA 用于 TRV-HSP70 植株中 *HSP70* 的 mRNA 定量 RT-PCR,*HSP70* mRNA 相对含量的计算参考文献[12]进行。

#### 1.5 Northern blot 分析 CMV 基因组含量

分别采集 CMV 侵染各个处理的寄主植物样品,并提取其总 RNA。总 RNA 甲醛变性电泳、转膜、杂交及检测的方法参考 DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 的产品使用说明书。CMV 基因组 RNA 杂交探针是同时与 CMV 基因组 RNA1~RNA3 的 3'端非编码区保守区域互

补的长度为 41 bp 的单链 DNA,探针的 3'端用地高辛标记(5' GACTGACCATTTTAGCCGTAAGCTGGATGGACAACCCGTTTC-DIG 3'),溴化乙锭染色的 RNA 电泳甲醛变性胶中 RNA 条带为上样的内参。

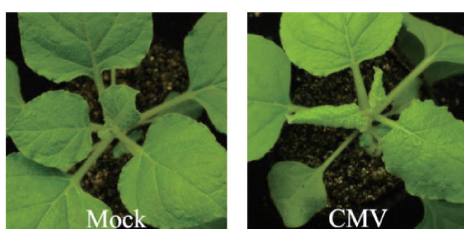
#### 1.6 蛋白杂交检测 *HSP70* 瞬时表达与 GFP 含量

分别采集各个处理的本氏烟浸润接种叶,称取 0.1 g 液氮研磨至粉末,并加入 100  $\mu$ L 磷酸缓冲液提取植物总蛋白;SDS-PAGE 电泳、转膜、抗体杂交以及化学发光检测的具体方法参考文献[21],其中:*HSP70* 瞬时表达的蛋白杂交检测抗体为 Myc-标签的单克隆抗体,1a2aR3-*gfp* 本氏烟中 GFP 的蛋白杂交检测抗体为 GFP 单克隆抗体。

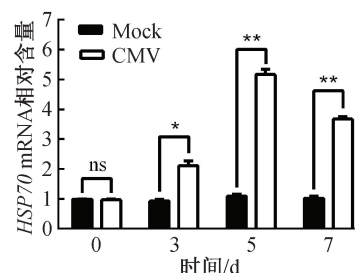
## 2 结果与分析

### 2.1 CMV 侵染的本氏烟中 *HSP70* 含量变化

为了明确植物中 *HSP70* 表达水平与 CMV 侵染之间的相关性,以浸润缓冲液为对照接种(Mock),通过定量 RT-PCR 检测了 CMV 接种不同时期本氏烟中 *HSP70* 的 mRNA 相对含量,结果如图 1 所示。图 1(a)显示:接种 5 d,CMV 接种的本氏烟系统叶中呈现皱缩、卷曲症状,而 Mock 接种植株的系统叶平整、无症状表型,这说明了 CMV 系统性地侵染了本氏烟。CMV 接种 0、3、5 d 和 7 d,本氏烟顶端系统叶中 *HSP70* 的 mRNA 相对含量如图 1(b)所示,从图中可以看出:0 d,CMV 接种与 Mock 接种本氏烟中 *HSP70* 的 mRNA 相对含量无明显差异;3 d,CMV 接种本氏烟中 *HSP70* 的 mRNA 相对含量是对照接种植物中的约 2.0 倍;5 d,与对照相比,CMV 接种本氏烟叶中 *HSP70* 的 mRNA 相对含量增加了约 4 倍;7 d,本氏烟中 *HSP70* 的 mRNA 相对含量有所降低,但均高于 Mock 接种植株,这说明了 CMV 的侵染诱导了植物中的 *HSP70* 上调表达,与 Chen 等<sup>[20]</sup>所报道的结果相一致。



(a) CMV 接种 5 d 在本氏烟中的症状



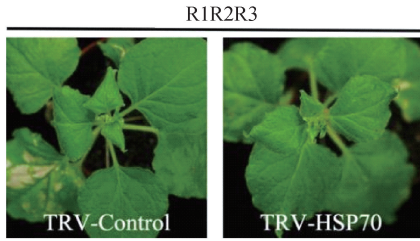
(b) 本氏烟中 *HSP70* 的 mRNA 相对含量柱状图

图 1 CMV 不同接种时间本氏烟中 *HSP70* mRNA 含量变化的柱状图

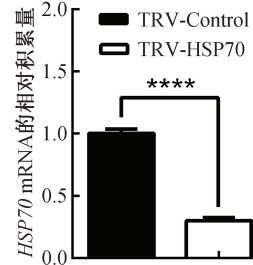
注:ns 表示无明显差别;\* 为  $P < 0.01$ ; \*\* 为  $P < 0.001$ 。

在 CMV 侵染本氏烟中 *HSP70* 表达水平增加,说明 *HSP70* 可能参与病毒侵植物的过程。为了确定 *HSP70* 是否影响 CMV 在本氏烟中症状反应和病毒积累量,采用烟草脆裂病毒(Tobacco rattle virus, TRV)介导的基因沉默技术降低本氏烟中 *HSP70* 表达量,*HSP70* 下调表达本氏烟中 CMV 的症状反应与基因组积累量如图 2 所示。在 TRV-*HSP70* 处理的本氏烟中,CMV 引起植株系统叶产生严重的皱缩、卷曲症状,对照处理的本氏烟中 CMV 表现为叶片轻微卷曲,*HSP70* 的 mRNA 相

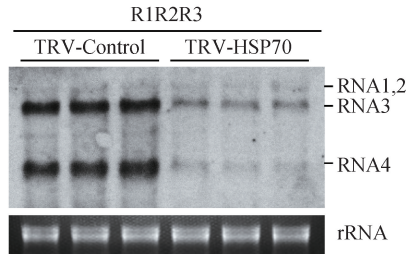
对积累量为对照处理(TRV-Control)的 23.7%,(见图 2(a)—(b)),说明 *HSP70* 影响了 CMV 在本氏烟中引起的症状反应。分别提取各个处理植株系统叶的总 RNA 用于 CMV 基因组 RNA 杂交检测,结果图 2(c)所示。从图 2(c)中可以看出:CMV 在 TRV-Control 处理本氏烟中的基因组 RNA1、RNA2 和 RNA3 含量均明显高于 TRV-*HSP70* 处理植株。与对照处理的本氏烟相比,在 TRV-*HSP70* 处理的本氏烟中,CMV 症状反应减轻、基因组 RNA 含量降低,说明了 *HSP70* 正调控 CMV 侵染本氏烟的过程。



(a) CMV在*HSP70*下调表达的本氏烟中的症状



(b) 本氏烟中*HSP70*的mRNA相对积累量柱状图



(c) *HSP70*下调表达本氏烟中CMV基因组含量的RNA杂交

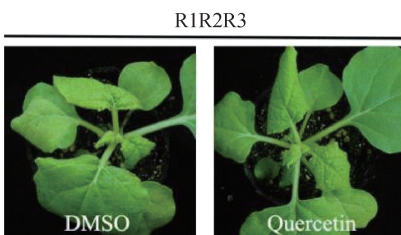
图 2 CMV 在 *HSP70* 下调表达本氏烟的症状与基因组含量

注:\*\*\*\*表示  $P < 0.0001$ ,RNA 为各个样品中总 RNA 上样量的内参,用于确定样品中总 RNA 量。

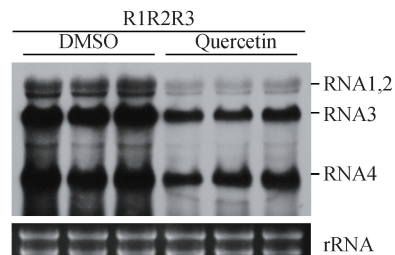
## 2.2 槲皮素处理对 CMV 基因组含量的影响

槲皮素(Quercetin)是一种生物类黄酮,能特异性抑制生物体中 *HSP70* 的 mRNA 翻译成蛋白的过程,降低细胞中 *HSP70* 含量<sup>[22]</sup>,在植物中可通过溶解于 DMSO 的槲皮素来处理叶片来抑制细胞中 *HSP70* 的合成,用于分析 *HSP70* 对病毒侵染本氏烟的影响<sup>[23-24]</sup>。以 DMSO 为对照,预先用质量浓度 200 ng/mL 的槲皮素处理本氏烟叶片 6 h,再

在该叶片农杆菌浸润接种 CMV;接种 5 d,本氏烟中 CMV 症状反应和基因组积累量如图 3 所示。植株中呈现的叶片卷曲、皱缩程度明显强于经槲皮素预先处理的植株;在 DMSO 预先处理本氏烟中,CMV 基因组 RNA 积累量也高于槲皮素处理寄主植物(见图 3),说明了本氏烟中 *HSP70* 含量的减少降低了 CMV 基因组含量,并减轻病毒的症状反应。



(a) CMV在经Quercetin处理植株中产生的症状



(b) Quercetin处理植株中CMV基因组RNA含量

图 3 CMV 在槲皮素处理本氏烟中引起症状与病毒含量

注:槲皮素母液用 DMSO 配制,质量浓度为 20 mg/mL,用无菌  $H_2O$  稀释至 100 倍用于注射本氏烟叶片。

### 2.3 HSP70 过量表达对 CMV 侵染的影响

为了进一步证实 HSP70 参与 CMV 侵染植物的过程,通过 T-DNA 载体在本氏烟中瞬时表达 HSP70,并分析 CMV 在 HSP70 瞬时表达植株中的症状反应与基因组含量,结果如图 4 所示。在 HSP70 瞬时表达(HSP70)本氏烟中,Western blot 能特异地检测到目的蛋白条带,对照(Vector)植株中则检测不到(见图 4(c));接种 3 d,与 Mock(浸

润缓冲液)接种的本氏烟相比较,在对照植株系统叶中呈现轻微皱缩症状,HSP70 瞬时表达的本氏烟中 CMV 产生了明显的叶片卷曲、皱缩表型(见图 4(a));在 HSP70 过表达的本氏烟系统叶中 CMV 基因组 RNA 含量明显高于对照处理(见图 4(b)),这说明了寄主植物中 HSP70 表达量增加有利于 CMV 侵染,引起病毒的症状反应加重与基因组积累量增加。

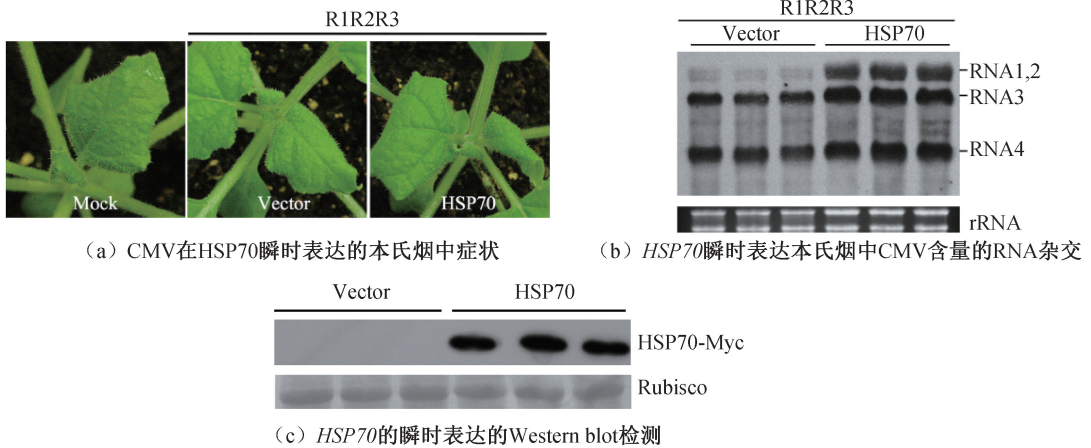


图 4 CMV 在 HSP70 过表达植株中症状和病毒含量

注:Rubisco 是植物中的二磷酸核酮糖羧化酶,用作各个样品中总蛋白上样量的内参。

### 2.4 HSP70 影响 CMV 基因组的复制

为了进一步探讨 HSP70 影响 CMV 侵染本氏烟的分子机制,分析 CMV 微型复制子 1a2aR3-*gfp* 在 HSP70 瞬时表达本氏烟中基因组含量与 GFP 的表达水平,结果如图 5 所示。由图 5 可以看出:与对照相比(Vector),在 HSP70 瞬时(HSP70)的浸润接种叶中,1a2aR3-*gfp* 的绿色荧

光表型、RNA3/RNA4 的含量和 GFP 表达量均明显增加,通过蛋白杂交也特异地检测到 HSP70 在浸润叶中表达,说明了 HSP70 增加有利于 1a2aR3-*gfp* 侵染本氏烟。1a2aR3-*gfp* 在侵染本氏烟过程中,不涉及病毒胞间移动和系统性的扩展,这表明 HSP70 通过正调控 CMV 基因组 RNA 复制来影响其侵染过程。

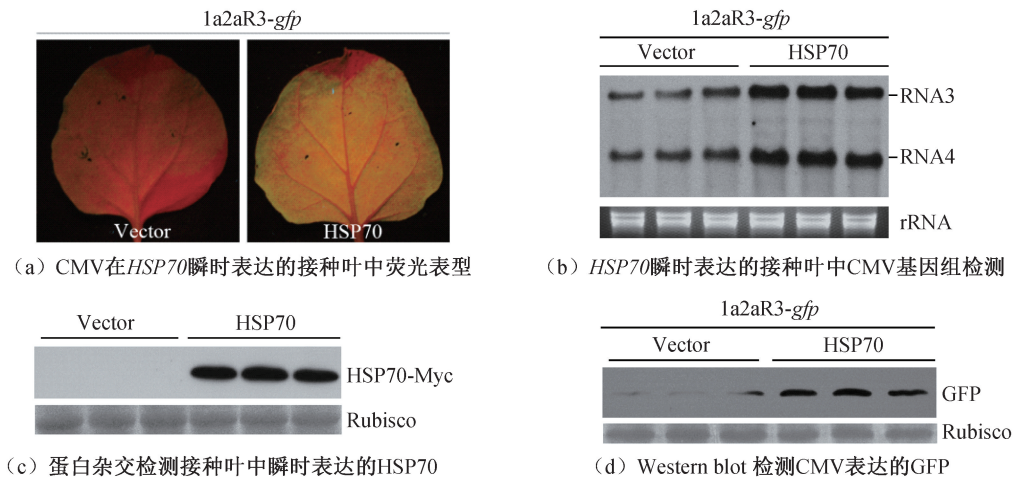


图 5 CMV 微型复制子在 HSP70 过表达本氏烟中荧光表型和病毒含量

### 3 讨论

HSP70 作为重要的分子伴侣,在众多植物病毒(如 TBV、AbMV 和 BYDV 等)的生命周期中起着极其关键作用,如参与复制复合体的形成、病毒蛋白折叠、病毒粒子组装或运动等过程<sup>[5-9,11-13]</sup>。本文发现 CMV 侵染诱导 HSP70 表达上调至少 2 倍(见图 1(b)),表明 CMV 同样主动利用或劫持了该蛋白,与 Chen 等<sup>[20]</sup>和其他研究<sup>[11,13,19]</sup>所报道的结果相一致,进一步证实病毒侵染寄主植物对 HSP70 存在普遍依赖性。

与对照相比,在 HSP70 下调表达和 HSP70 合成受抑制的本氏烟中,CMV 症状反应减轻和基因组 RNA 积累量降低(见图 2 和图 3);HSP70 瞬时表达植株中,CMV 引起系统叶卷曲、皱缩的表型更为明显,病毒基因组含量明显增加(见图 4),这说明 HSP70 正调控了 CMV 侵染寄主植物的过程。CMV 侵染过程包括基因组复制、细胞间移动和长距离运输环节<sup>[16]</sup>,HSP70 参与 CMV 侵染过程有可能是影响基因组的复制,也有可能是调控病毒运动。在 1a2aR3-*gfp* 中,通过 T-DNA 载体瞬时表达 CMV 的复制酶 1a 和 2a,该载体不能产生 CMV 基因组 RNA1 和 RNA2,瞬时表达复制酶 1a 和 2a 来驱动基因组 R3-*gfp* 的复制产生 RNA3 和亚基因组 RNA4,在该复制子侵染的植物中 RNA 杂交只能检测到 RNA3 和 RNA4<sup>[25-26]</sup>。在 1a2aR3-*gfp* 中,CMV 的基因组 RNA3 中的外壳蛋白被绿色荧光蛋白替代,但该病毒的细胞与细胞之间移动和长距离运输均需要外壳蛋白的参与<sup>[27]</sup>,1a2aR3-*gfp* 在本氏烟中不能进行运动。在 1a2aR3-*gfp* 中,观察到 HSP70 过表达明显增强浸润叶中绿色荧光强度、RNA3/RNA4 积累量及 GFP 蛋白水平(见图 5),该复制子系统排除了病毒运动(胞间/长距离)的干扰,这证明了 HSP70 是通过正调控 CMV 基因组 RNA 的复制过程来影响其侵染本氏烟。CMV 基因组复制在液泡膜上进行<sup>[17]</sup>,并需要大量寄主因子参与<sup>[18]</sup>,这暗示着 HSP70 有可能是 CMV 复制复合体的关键组成或调控因子,通过协助复制酶蛋白(1a/2a)的正确折叠、稳定复制复合体结构、促进复制相关蛋白的膜定位或招募其他必需的寄主因子等方式,直接调控 CMV 基因组的复制过程。BYDV 通过其 p3a 蛋白干扰 DOF 转录因子来调控 HSP70 表达<sup>[12]</sup>,而 CMV 侵染也明显诱导本氏烟中 HSP70 上调表达(见图 1),这表明不同病毒可能进

化出不同的策略来利用植物中 HSP70 来满足其侵染需求,CMV 是否通过类似或独特的机制调控 HSP70 转录,有待于进一步研究。

本文揭示了寄主 HSP70 通过正调控基因组 RNA 复制过程在 CMV 侵染中起关键作用,深化了对 CMV-寄主互作分子机制的理解,明确了 HSP70 在 CMV 复制环节的核心地位,为构建更完整的 CMV 复制模型、理解寄主因子如何被病毒利用以及开发基于干扰病毒-寄主因子互作的新型抗病毒策略奠定了重要的理论基础。

### 4 结论

本文分析 CMV 不同侵染时期本氏烟中 HSP70 的 mRNA 含量,评估 CMV 在 HSP70 mRNA 含量减少和 HSP70 合成受抑制的本氏烟中症状反应与基因组 RNA 水平,并测定运动能力丧失 CMV 在 HSP70 过表达本氏烟中的病毒含量,主要结论如下:

a)CMV 侵染诱导本氏烟中 HSP70 上调表达,CMV 侵染的本氏烟中 HSP70 mRNA 含量增加,增加水平至少为健康植株中 1 倍。

b)HSP70 mRNA 减少和 HSP70 合成受抑制的植物中,CMV 引起症状反应减轻、病毒基因组 RNA 积累量降低;HSP70 瞬时表达植物中 CMV 的症状加重、基因组 RNA 含量增加,HSP70 正调控 CMV 侵染植物的过程。

c)在瞬时表达 HSP70 的本氏烟中,CMV 微型复制子 1a2aR3-*gfp* 的基因组 RNA3 和 RNA4 含量、病毒表达的 GFP 含量均增加,HSP70 参与了 CMV 复制。

### 参考文献:

- [1] Koonin E V, Dolja V V, Krupovic M. The logic of virus evolution[J]. Cell Host Microbe, 2022, 30(7):917-929.
- [2] Singh M K, Shin Y, Ju S, et al. Heat shock response and heat shock proteins: Current understanding and future opportunities in human diseases [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(8): 4209.
- [3] Berka M, Kopecká R, Berková V et al. Regulation of heat shock proteins 70 and their role in plant immunity[J]. Journal of Experimental Botany, 2022, 73(7):1894-1909.
- [4] Yang L, Zhou Y, Wang S et al. Noncell-autonomous HSC70. 1 chaperone displays homeostatic feedback regulation by binding its own mRNA[J]. New Phytologist, 2023, 237(6):2404-2421.
- [5] Wu S, Zhao Y, Wang D, et al. Mode of action of heat shock

- protein (HSP) inhibitors against viruses through host HSP and virus interactions[J]. *Genes*, 2023, 14(4): 792.
- [6] 梅佳佳, 赵建元, 刘倩, 等. Hsp70 在病毒复制中的作用[J]. *病毒学报*, 2023, 39(2): 583-588.
- [7] 张蕾, 张培军, 郭曦尧, 等. 热应激蛋白与病毒免疫应答研究进展[J]. *中国预防兽医学报*, 2020, 42(2): 207-211.
- [8] Chang H H, Lee C H, Chang C J et al. FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase interacts with the movement protein of tomato leaf curl New Delhi virus and impacts viral replication in *Nicotiana benthamiana*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2022, 23(4): 561-575.
- [9] Alam S B, Rochon D. Cucumber necrosis virus recruits cellular heat shock protein 70 homologs at several stages of infection[J]. *Journal of Virology*, 2015, 90(7): 3302-3317.
- [10] Nagy P D. Co-opted membranes, lipids, and host proteins: What have we learned from tombusviruses? [J]. *Current Opinion in Virology*, 2022, 56: 101258.
- [11] Molho M, Prasanth KR, Pogany J et al. Targeting conserved co-opted host factors to block virus replication: Using allosteric inhibitors of the cytosolic Hsp70s to interfere with tomato bushy stunt virus replication[J]. *Virology*, 2021, 563: 1-19.
- [12] Tian S, Song Q, Cheng Y et al. A viral p3a protein targets and inhibits TaDOF transcription factors to promote the expression of susceptibility genes and facilitate viral infection[J]. *PLoS Pathogens*, 2024, 20(11): e1012680.
- [13] Kleinow T, Happel A, Kober S et al. Phosphorylations of the abutilon mosaic virus movement protein affect its self-Interaction, symptom development, viral DNA accumulation, and host range[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 1155.
- [14] Zhao L, Chen Y, Xiao X et al. AGO2a but not AGO2b mediates antiviral defense against infection of wild-type cucumber mosaic virus in tomato[J]. *Horticulture Research*, 2023, 10(5): uhad043.
- [15] Cheng Y, Zheng T, Yang D, et al. Cucumber mosaic virus impairs the physiological homeostasis of *Panax notoginseng* and induces saponin-mediated resistance[J]. *Virology*, 2024, 591: 109983.
- [16] Ham BK, Wang X, Toscano-Morales R et al. Plasmodesmal endoplasmic reticulum proteins regulate intercellular trafficking of cucumber mosaic virus in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2023, 74(15): 4401-4414.
- [17] Kim M J, Kim H R, Paek K H. *Arabidopsis* tonoplast proteins TIP1 and TIP2 interact with the cucumber mosaic virus 1a replication protein[J]. *Journal of General Virology*, 2006, 87(11): 3425-3431.
- [18] Huh S U, Kim M J, Ham B K et al. A zinc finger protein Tsip1 controls cucumber mosaic virus infection by interacting with the replication complex on vacuolar membranes of the tobacco plant[J]. *New Phytologist*, 2011, 191(3): 746-762.
- [19] Havelda Z, Maule A J. Complex spatial responses to cucumber mosaic virus infection in susceptible *Cucurbita pepo* cotyledons [J]. *Plant Cell*, 2000, 12(10): 1975-1986.
- [20] Chen Z R, Zhou T, Wu X H, et al. Influence of cytoplasmic heat shock protein 70 on viral infection of *Nicotiana benthamiana* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2008, 9(6): 809-817.
- [21] 王琳, 程晓东, 卢冉, 等. 黄瓜花叶病毒反式遗传复制体系的构建[J]. *浙江理工大学学报(自然科学版)*, 2019, 43(2): 262-266.
- [22] 史志恒, 曾嘉琳, 黄欣如, 等. 槲皮素及其衍生物抗病毒活性研究进展[J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39(18): 2412-2420.
- [23] Wang R Y, Stork J, Nagy P D. A key role for heat shock protein 70 in the localization and insertion of tombusvirus replication proteins to intracellular membranes[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(7): 3276-3287.
- [24] Jiang S, Lu Y, Li K et al. Heat shock protein 70 is necessary for rice stripe virus infection in plants[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2014, 15(9): 907-1017.
- [25] Seo J K, Kwon S J, Choi H S et al. Evidence for alternate states of cucumber mosaic virus replicase assembly in positive- and negative-strand RNA synthesis[J]. *Virology*, 2009, 383(2): 248-260.
- [26] Fujiki M, Kaczmarczyk J F, Yusibov V et al. Development of a new cucumber mosaic virus-based plant expression vector with truncated 3a movement protein[J]. *Virology*, 2008, 381(1): 136-142.
- [27] Ryabov E V, Roberts I M, Palukaitis P et al. Host-specific cell-to-cell and long-distance movements of cucumber mosaic virus are facilitated by the movement protein of groundnut rosette virus[J]. *Virology*, 1999, 260(1): 98-108.

## 团队介绍

杜志游教授团队长期致力于植物病毒分子生物学研究, 聚焦于黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)及其卫星 RNA 的致病机理、复制调控与病毒-寄主-昆虫三者互作关系以及抗病毒新策略等关键科学问题展开系统攻关。团队围绕病毒复制调控、RNA 沉默抑制机制、病毒与宿主免疫系统的互作等关键科学问题, 在国家自然科学基金、欧盟玛丽居里国际人才计划、浙江省自然科学基金等项目支持下, 持续开展系统性研究。在 CMV 2b 蛋白的分子功能、病毒基因组 RNA 结构与转录调控机制, 以及卫星 RNA 对 CMV 复制与致病性的调节作用等方面取得多项创新成果, 提出了 2b 蛋白核质分布调控其致病与沉默抑制双重功能的新机制, 阐明了卫星 RNA 选择性抑制 CMV 基因组不同片段复制的结构基础, 构建并优化了 CMV 衍生的病毒载体系统, 拓展了其在植物基因功能研究中的应用潜力。近年来, 团队发表 SCI 论文 30 余篇, 主持国家自然科学基金项目 5 项; 杜志游教授曾任欧盟 Marie Curie 国际学者, 入选浙江省 151 人才工程与浙江理工大学“521 中青年拔尖人才”计划。